



Estudio de la biodisponibilidad de diurón envejecido en suelos de uso agrícola

Study of the bioavailability of diuron aged in agricultural soils

Rubio-Bellido, M.^{*}, Villaverde, J., Lara, A., Morillo, E.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052,41080, Sevilla (España)

^{*} mrubio@irnase.csic.es

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar la relación entre la biodisponibilidad del herbicida diurón envejecido (hasta 100 días), realizando ensayos de mineralización, y las cantidades detectadas mediante extracciones no exhaustivas, en 10 suelos con diferentes propiedades físico-químicas. En este estudio, los tres agentes extractantes seleccionados fueron butanol, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD) y CaCl₂. Los ensayos de mineralización se llevaron a cabo para estimar la fracción del herbicida diurón capaz de ser mineralizada en los suelos por un consorcio microbiano degradador específico de este herbicida diseñado en nuestros laboratorios. Las correlaciones lineales entre las extracciones y las mineralizaciones en dichos ensayos mostraron que la extracción con butanol resulta la técnica más fiable a la hora de predecir la disponibilidad de diurón (r^2 0.97, 1.56 pendiente y la intersección -31.9). HPBCD resultó ser el segundo mejor extractante seguido de CaCl₂. Los resultados obtenidos demostraron que la extracción con butanol puede servir en un suelo contaminado como un procedimiento sencillo y rápido para la estimación de la biodisponibilidad de diuron en suelo aportando una información útil respecto a la potencial toxicidad del residuo envejecido así como sobre la necesidad o viabilidad de la aplicación de una técnica de biorrecuperación *in situ*.

Palabras clave: diurón, biodisponibilidad, extracción no exhaustiva, suelos contaminados, mineralización.

Abstract

This study was conducted to determine the relationship between bioavailability, measured by biomimetic assays, of aged herbicide diuron in 10 selected soils with different properties and the amounts extracted by mild solvents. The three selected mild extractants were butanol, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and CaCl₂. Biomimetic assays were conducted to estimate the diuron fraction capable to be mineralised in soil by a specific diuron degrader microbial consortium designed in our laboratories. Biomimetic results showed that the diuron fraction extracted by butanol was the most reliable chemical technique capable to predict both, diuron availability for mineralisation (r^2 0.97, slope 1.56 and intercept -31.9). HPBCD was the second mild extractant capable to estimate the biomimetic results being the worst results showed by using CaCl₂ solution. The data presented demonstrated that a solvent extraction (butanol) procedure may serve as the basis for a simple and rapid procedure for assessing diuron bioavailability in soils with different characteristics.

Keywords: Diuron, bioavailability, mild extractions, contaminated soil, mineralisation.

Introducción

Actualmente, existe un interés científico en encontrar técnicas químicas capaces de predecir la biodisponibilidad a largo plazo de residuos de compuestos orgánicos contaminantes. El principal objetivo de cuantificar la biodisponibilidad consiste en poder predecir hasta qué punto el empleo de estrategias microbiológicas para la recuperación de suelos contaminados serán efectivas. La mayoría de los estudios han preferido el uso de diferentes técnicas de extracción, las cuales han sido divididas en exhaustivas y no exhaustivas.

Las técnicas exhaustivas ofrecen una sobreestimación de la toxicidad real, ya que todo el contaminante es extraído y no sólo la fracción que es realmente biodisponible. En cambio las extracciones no exhaustivas pretenden extraer la fracción del contaminante con distinta labilidad [1].

Por lo tanto, para establecer la potencial biodisponibilidad de un contaminante, es necesario establecer correlaciones entre la disponibilidad medioambiental obtenida por métodos químicos y la biodisponibilidad real del contaminante en un suelo determinado.

El objetivo de este trabajo pretende evaluar la biodisponibilidad de residuos envejecidos del herbicida diurón, un herbicida peligroso para el ambiente y persistente en suelos, correlacionando técnicas químicas (técnicas de extracción no exhaustivas) y biológicas (mineralizaciones).

Material y métodos

Herbicida: diurón en polvo (pureza > 98%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España).

Cepas Bacterianas: *Arthrobacter* sp. N2, adquirida de la colección del Instituto Pasteur (Francia); *Variovorax* sp. SRS16 proporcionada por S.R. Sorensen y *Advenella* sp. JRO, aislada en nuestro laboratorio de un suelo contaminado industrial.

Suelos: 10 suelos con diferentes propiedades físico-químicas procedentes del sur de España (Tabla 1).

Extractantes: Butanol, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD) y CaCl_2 .

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los suelos empleados.

Suelos	pH	CO_3^{2-} (%)	MO (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clasificación Textural
1	8,58	11,0	0,20	95,3	4,10	0,60	Arenoso
2	8,68	11,6	0,66	73,9	16,1	10,0	Franco arenoso
3	8,73	27,5	1,75	59,4	15,9	24,6	Franco arenoso
4	6,00	0,00	1,41	16,7	58,6	24,7	Franco limoso
5	8,30	21,4	2,91	64,0	16,5	18,3	Franco arenoso
6	8,24	9,70	1,67	47,0	17,1	34,5	Franco arcilloso
7	8,00	24,1	1,76	2,70	31,5	65,9	Arcilloso
8	5,50	0,00	1,56	49,8	34,5	15,7	Franco
9	6,97	2,00	2,13	31,6	53,6	14,8	Franco limoso
10	6,23	1,60	3,37	24,2	59,4	16,4	Franco limoso

Envejecimiento de suelos contaminados con diurón

Los 10 suelos fueron contaminados para obtener concentraciones de diurón de 50 mg kg⁻¹, y se dejaron envejecer durante distintos periodos de tiempo (0, 15, 30, 60 y 100 días). Los suelos habían sido previamente esterilizados en autoclave y cerrados herméticamente para evitar la degradación de diurón durante el envejecimiento. A los distintos tiempos de envejecimiento se tomaron muestras de cada uno de los 10 suelos y fueron congeladas hasta el momento de ser sometidas en paralelo a procesos de mineralización y de extracción. A los suelos destinados a procesos de mineralización se les añadió 450 Bq de ¹⁴C.

Experimentos de mineralización

Se utilizaron respirómetros que constan de un cuerpo principal con matraz de vidrio de 250 mL de capacidad, en cuyo interior se añadieron 50 mL de medio MSM, 10 g de suelo el cual llevaba el diurón no marcado y marcado con ¹⁴C, 1 mL de solución de nutrientes [2] y los inóculos de las cepas bacterianas. En la parte superior del matraz se coloca un tapón envuelto en cinta de teflón con una trampa de álcali suspendida (1 mL de NaOH 0,5N), la cual será la encargada de recoger la producción de ¹⁴CO₂, que será medido posteriormente en el Contador de centelleo.

Experimentos de extracción

A tiempo 0 días y a determinados intervalos de tiempo de envejecimiento (15, 30, 60 y 100 días) se tomaron muestras de cada uno de los 10 suelos y se llevaron a

cabo extracciones con 3 extractantes de distinta hidrofobicidad: butanol, una solución HPBCD a una concentración 10 veces la concentración de molar de diuron—una solución de CaCl_2 (10 mM). Dos gramos de suelo contaminado se extrajeron con 5 mL de cada extractante. Los tubos se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm a 20 ± 1 °C durante 24 horas. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas (a 11000 rpm durante 10 minutos y 20 ± 1 °C de temperatura) y el sobrenadante se analizó por HPLC con un detector UV (longitud de onda: 230 nm; fase móvil: acetonitrilo:agua, 60:40; flujo: 0,6 L/ min y columna Kromasil C18) para detectar la cantidad de diuron extraído.

Resultados y discusión

En la Tabla 2 se muestran las cantidades extraídas con los tres extractantes estudiados (butanol, HPBCD y CaCl_2) y el porcentaje global de mineralización a los diferentes tiempos de envejecimiento. En todos los casos se observa una importante influencia del envejecimiento en el perfil de mineralización y de extracción del compuesto.

La extensión global de mineralización de cada suelo se redujo considerablemente a medida que el tiempo de envejecimiento fue mayor, sobre todo en el suelo 5 donde el porcentaje global de mineralización osciló entre 93,7% y 0,55%, para el tiempo 0 y después de 100 días de envejecimiento, respectivamente.

En general, hay un descenso en la biodisponibilidad de un contaminante cuando se produce la formación de residuos a través de los procesos de envejecimiento y como resultado, los contaminantes retenidos pasan a constituir una fracción no biodisponible [3].

Por otro lado, existen diferencias en las cantidades extraídas del herbicida con las diferentes soluciones de CaCl_2 , HPBCD o butanol (Tabla 2). Sin embargo, las cantidades extraídas utilizando la solución de HPBCD x10 fueron cada vez más similares a las cantidades extraídas con la solución de CaCl_2 al ir aumentando el tiempo de envejecimiento. Algo que se debe a la progresiva

reducción de la fracción biodisponible del herbicida con el tiempo de envejecimiento, permaneciendo biodisponible únicamente aquella muy débilmente adsorbida a las partículas del suelo. La eficacia de extracción de una solución acuosa como es la HPBCD se debe a la formación de complejos de inclusión en solución entre la molécula hidrofóbica del herbicida y la CD, actuando HPBCD como agente extractante de las moléculas del herbicida diuron que están adsorbidas.

Las correlaciones lineales entre el porcentaje de diuron mineralizado y el porcentaje extraído en los 10 suelos a diferentes tiempos de envejecimiento se muestran en la Figura 1.

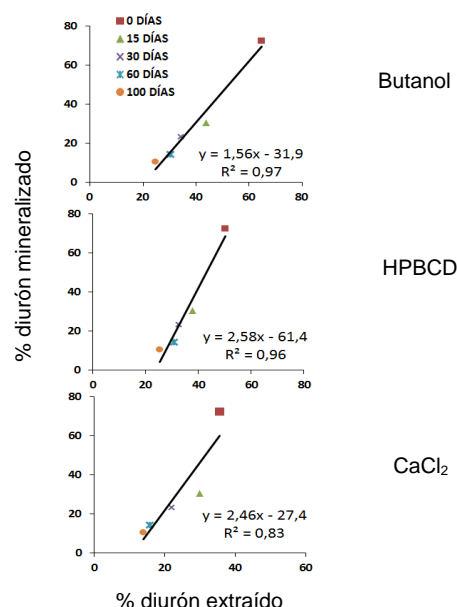


Figura 1. – Correlación lineal global entre el porcentaje extraído y el porcentaje total mineralizado a diferentes tiempos de envejecimiento para cada extractante.

Correlacionando los porcentajes extraídos con butanol o HPBCD con los porcentajes de diuron mineralizado en los 10 suelos se obtuvieron valores de un R^2 de 0,96-0,97, respectivamente. En las correlaciones obtenidas con CaCl_2 se obtiene un R^2 de 0,83. La información que aportan los valores de R^2 no permite establecer cuál es el agente extractante más idóneo para estimar la biodisponibilidad de diuron en los suelos investigados. La pendiente y la intersección de la curva en el eje y (% de diuron mineralizado), realmente son las que

Tabla 2. Porcentaje de diurón extraído con butanol, HPBCD óCaCl₂ y el porcentaje diurón mineralizado a diferentes tiempos de envejecimiento en los10 suelos.

Suelos/ Tiempo de envejecimiento					% Extraído de Diurón			¹⁴ C-Diurón mineralizado (%)			
					BuOH	HPBCD	CaCl ₂				
1	0	69,7 (± 9,80)	70,1 (± 9,92)	53,7 (± 14,2)	67,5 (± 2,41)	5	0	40,7 (± 1,35)	26,9 (± 4,01)	20,0 (± 0,72)	77,1 (1,62)
	15	50,1 (± 10,1)	51,2 (± 11,4)	35,2 (± 0,14)	16,1 (± 5,53)		15	32,6 (± 3,45)	13,7 (± 9,44)	15,4 (± 1,12)	36,5 (3,28)
	30	34,9 (± 6,24)	36,0 (± 4,52)	23,9 (± 2,95)	13,3 (± 6,58)		30	31,9 (± 4,26)	9,90 (± 1,19)	13,0 (± 2,25)	32,9 (6,07)
	60	32,1 (± 13,5)	33,2 (± 13,5)	21,3 (± 3,59)	2,20 (± 0,21)		60	33,9 (± 6,14)	7,28 (± 1,99)	10,3 (± 4,95)	28,4 (1,52)
	100	23,5 (± 13,9)	25,2 (± 13,9)	19,4 (± 3,08)	1,24 (± 0,04)		100	27,8 (± 3,25)	6,31 (± 0,72)	6,63 (± 4,12)	24,6 (3,07)
2	0	47,0 (± 0,40)	46,1 (± 0,41)	29,8 (± 1,27)	83,1 (± 3,34)	7	0	70,2 (± 4,25)	61,0 (± 2,01)	49,9 (± 3,04)	73,2 (4,99)
	15	25,2 (± 6,22)	24,6 (± 11,2)	27,8 (± 4,52)	31,3 (± 1,52)		15	44,4 (± 7,36)	43,9 (± 4,53)	34,9 (± 1,75)	17,2 (4,01)
	30	18,4 (± 9,02)	17,3 (± 9,02)	20,4 (± 2,18)	19,7 (± 6,02)		30	30,2 (± 2,81)	43,1 (± 1,60)	15,6 (± 1,51)	15,9 (7,57)
	60	12,1 (± 3,22)	13,5 (± 3,26)	4,10 (± 0,51)	6,67 (± 1,24)		60	26,8 (± 9,49)	44,3 (± 1,27)	6,40 (± 6,18)	6,33 (0,16)
	100	6,20 (± 1,51)	6,0 (± 2,03)	3,25 (± 1,84)	4,47 (± 2,22)		100	19,3 (± 20,8)	40,1 (± 1,45)	4,32 (± 9,25)	2,47 (0,74)
3	0	87,2 (± 3,01)	98,2 (± 5,02)	63,0 (± 2,93)	94,9 (± 1,23)	8	0	73,3 (± 2,28)	39,3 (± 4,72)	37,8 (± 3,12)	65,4 (4,92)
	15	70,6 (± 1,60)	70,1 (± 1,60)	65,2 (± 3,25)	24,5 (± 2,36)		15	49,5 (± 13,9)	31,6 (± 8,28)	36,3 (± 1,75)	37,0 (4,26)
	30	66,9 (± 5,13)	65,2 (± 3,25)	58,9 (± 0,97)	21,7 (± 0,25)		30	32,1 (± 13,8)	26,5 (± 2,83)	16,2 (± 0,16)	19,7 (1,47)
	60	62,2 (± 5,08)	63,2 (± 5,07)	48,8 (± 0,89)	5,37 (± 1,14)		60	30,0 (± 2,51)	24,7 (± 2,37)	7,74 (± 2,91)	5,70 (0,52)
	100	61,6 (± 3,65)	58,2 (± 2,53)	49,1 (± 1,30)	3,84 (± 4,03)		100	29,5 (± 4,25)	18,5 (± 3,74)	6,35 (± 0,82)	3,60 (0,10)
4	0	73,0 (± 14,3)	36,3 (± 0,29)	27,6 (± 1,17)	60,2 (± 4,80)	9	0	35,7 (± 5,01)	28,1 (± 3,88)	12,9 (± 0,11)	98,9 (4,73)
	15	30,7 (± 3,12)	28,7 (± 0,42)	21,6 (± 1,08)	24,7 (± 1,32)		15	25,1 (± 12,9)	23,9 (± 0,44)	10,6 (± 1,24)	39,7 (7,68)
	30	28,6 (± 7,56)	25,7 (± 1,10)	19,8 (± 0,26)	16,7 (± 0,92)		30	23,7 (± 3,01)	20,6 (± 3,74)	4,73 (± 1,52)	34,1 (4,18)
	60	25,0 (± 2,28)	23,9 (± 0,98)	18,9 (± 0,68)	8,93 (± 5,49)		60	18,8 (± 2,04)	21,9 (± 3,29)	3,20 (± 0,55)	25,0 (0,43)
	100	24,5 (± 3,82)	22,3 (± 0,89)	18,3 (± 0,75)	1,20 (± 4,31)		100	10,6 (± 1,35)	12,7 (± 6,40)	2,78 (± 0,22)	16,7 (6,09)
5	0	68,6 (± 4,67)	61,9 (± 1,28)	32,9 (± 2,50)	93,7 (± 2,71)	10	0	82,2 (± 6,81)	35,2 (± 10,5)	28,1 (± 8,21)	71,7 (2,74)
	15	56,8 (± 5,03)	57,5 (± 0,94)	31,1 (± 4,28)	16,5 (± 6,17)		15	52,5 (± 6,02)	32,9 (± 11,8)	19,7 (± 1,38)	59,3 (0,45)
	30	47,3 (± 2,34)	53,8 (± 3,67)	29,2 (± 0,66)	6,60 (± 6,01)		30	21,2 (± 2,15)	29,3 (± 8,35)	18,1 (± 6,34)	50,9 (8,26)
	60	44,9 (± 6,30)	50,2 (± 0,83)	25,5 (± 1,75)	5,50 (± 1,42)		60	18,2 (± 0,21)	26,3 (± 12,3)	10,7 (± 4,21)	47,2 (13,9)
	100	26,4 (± 7,66)	39,6 (± 2,73)	22,4 (± 4,68)	0,55 (± 0,10)		100	16,7 (± 1,97)	24,4 (± 0,52)	6,63 (± 4,97)	43,9 (0,26)

deben ser consideradas [4], es decir, los valores ideales para concluir cuál de las extracciones no exhaustivas puede ser empleada para evaluar la biodisponibilidad de diurón en un suelo contaminado serían que la pendiente fuera lo más cercana al valor 1 y la intersección con el eje Y fuera, en la medida de lo posible, lo más parecido al valor 0.

En las 3 correlaciones los datos de extracción subestiman los resultados de mineralización, ya que la pendiente en todos los casos fué mayor de 1. Aunque las pendientes obtenidas en las correlaciones empleando butanol y HPBCD son muy similares, el valor de la intersección con el eje Y es más favorable al butanol, logrando mimetizar más adecuadamente la actividad biológica del consorcio bacteriano empleado. Las correlaciones obtenidas al emplear CaCl₂ como extractante fueron las que peores resultados dieron.

Conclusiones

Con estos resultados se podría considerar que la técnica de extracción con butanol es la que imita más estrechamente los mecanismos que gobiernan la biodisponibilidad del contaminante hacia microorganismos degradadores específicos pudiendo propor-

cionar un medio fiable para determinar la fracción biodisponible del herbicida diurón de un suelo y aplicarse en la evaluación de la aplicación de técnicas de biorrecuperación de suelos contaminados con diurón.

Agradecimientos

Proyecto de investigación CTM 2013-42599-R (cofinanciado por FEDER) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Rubio- Bellido, M. agradece por el contrato de investigación disfrutado gracias al proyecto P12-RNM-894.

Referencias

- [1] Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T. (2000). Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 34, 3174-3179.
- [2] Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Sánchez-Trujillo, M.A., Morillo, E. 2012. Enhanced mineralization of diuron using a cyclodextrin-based bioremediation technology. *J. Agri. Food Chem.* 60, 9941-9947.
- [3] Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, 38, 228A-231A.
- [4] Cachada, A., Pereira, R., Ferreria da Silva, E., Duarte, A.C. (2014). The prediction of PAHs bioavailability in soils using chemical methods: state of the art and future challenges. *Science of the Total Environment*, 472, 463-480.